

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-193059

(43)Date of publication of application : 30.07.1990

(51)Int.Cl. G01N 27/416

// C08F 8/32

C08F 26/06

C12Q 1/00

G01N 27/327

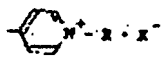
(21)Application number : 63-238187 (71)Applicant : KAO CORP

(22)Date of filing : 22.09.1988 (72)Inventor : SAKATA
MASARU
TANIGAKI
MASANOBU
KONDO
AKIHIRO
TOTOKI
SHINTARO
KAWABATA
NARIAKI

(54) MICROORGANISM SENSOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable measurement of a concn. of a desired material quickly with reproducibility by arranging a container which is filled with a non-water soluble carrier whose surface is covered with a high polymer containing a pyridinium group as given by a specified formula in the molecule, and an electrochemical device to determine a substance which is generated or consumed with the action of microorganisms being separated from each other.



CONSTITUTION: This sensor is equipped with a container which is filled with a non-water soluble carrier whose surface is covered with a high polymer containing a pyridinium group as given by a formula (wherein R represents a benzene group, a phenethyl group, a 1-16C alkyl group or a pentafluorophenyl methyl group and X a halogen atom) for adsorption of a microorganism in a molecule and an electrochemical device to determine a substance which is generated or consumed with the action of the microorganisms being separated from each other. The high polymer containing a pyridinium group in the molecule includes a benzyl group and phenethyl group or the like. The use of this sensor enables measurement of various substances such as saccharides quickly and easily in addition to BOD in water.

LEGAL STATUS

[Date of request for
examination]

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of
application other than the
examiner's decision of
rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for
application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against
examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal
against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-193059

⑬ Int. Cl.³ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成2年(1990)7月30日
 G 01 N 27/416
 // C 08 F 8/32 MHH 7921-4J
 26/06 MNM 8620-4J
 C 12 Q 1/00 B 6807-4B
 G 01 N 27/327
 7363-2G G 01 N 27/46 3 0 1 N
 7363-2G // G 01 N 27/30 3 5 5
 審査請求 未請求 請求項の数 1 (全21頁)

⑮ 発明の名称 微生物センサー

⑯ 特 願 昭63-238187

⑰ 出 願 昭63(1988)9月22日

⑱ 発 明 者 坂 田 勝 和歌山県那賀郡岩出町畑毛283-24
 ⑱ 発 明 者 谷 垣 雅 信 和歌山県和歌山市大谷845-9
 ⑱ 発 明 者 近 藤 昭 裕 和歌山県和歌山市西浜3丁目8-59
 ⑱ 発 明 者 十 時 信 太 郎 和歌山県和歌山市西浜1130
 ⑱ 発 明 者 川 端 成 彬 大阪府大阪市西成区潮路1丁目2-24
 ⑲ 出 願 人 花 王 株 式 会 社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
 ⑳ 代 理 人 弁 理 士 有 賀 三 幸 外2名

明 細 書

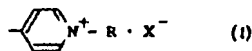
特 許 要 求 書

1. 発明の名称

微生物センサー

2. 特許請求の範囲

1. 微生物を吸着させるための、一般式(1)



(式中、Rはベンジル基、フェニル基、C₁～C₁₀アルキル基又はペンタフルオロフェニル基、Xはハロゲン原子を示す)
 で表わされるポリジニウム基を分子中に含む高分子で表面を覆われた水不溶性担体を充填した容器と、これら微生物の作用により生成あるいは消費される物質を定量する電気化学デバイスと、それぞれ分離して設置したことを

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、微生物センサーに関する。

(従来の技術)

酵素や微生物等の生体触媒は、従来の物理化学センサーにない高度な分子識別機能を有しており、近年、これらの生体触媒と電気化学デバイスを組み合わせた、いわゆるバイオセンサーの開発が各方面で活発に行われている。この様な生体触媒を分子識別素子として利用するためには、生体触媒の有する機能を失うことなく固定化(不溶化)する必要がある。生体触媒の固定化法としては、(1)共有結合法、(2)架橋法、(3)包括法、(4)吸着法等の方法があ

るが、一般にその操作は煩雑であり、また各生体触媒に対して不変的な固定化方法はなく適切な固定化法を見い出すまでにかなりの検討が必要である。

特開昭62-238454号では、架橋ポリスチレン、架橋ポリビニルピリジン等のビニル系高分子、架橋ポリアクリル酸エステル、架橋ポリメタアクリル酸等のアクリル系高分子、フェノール/ホルムアルデヒド樹脂等の縮合系高分子を母体としたアミノ基、ピリジル基、テトラアルキルアンモニウム基、テトラアリールアンモニウム基、テトラアリーールアンモニウム基、ピリジニウム基等を有する水不溶性高分子材料に好気性微生物を吸着させて隔膜式酸素電極の下方に設置させた微生物センサーを報告している。すなわち、特開昭62-238454号で開示されている微生物センサーは第1図に示す様に、微生物を吸着させる水不溶性高分子材料を隔膜式酸素電極の隔膜の下方に設置することによつて構成されている。

この様なセンサーの使用法は、BODを測定する場合を例に取つて説明すれば次の通りである。まず樹脂充てん部を微生物懸濁液に浸漬し、微生物を吸着させる。次に、緩衝液あるいはイオン交換水等で洗浄し、溶存酸素濃度が安定した所で、有機物を添加する。溶存酸素濃度は徐々に低下し20～30分後に一定値を示す。この溶存酸素濃度減少量と有機物濃度の間には相関関係を有することが確認

されている。すなわち、微生物を吸着させる水不溶性高分子材料を隔膜式酸素電極の隔膜の下方に設置することによつて構成されている。

されておる溶存酸素濃度減少量を測定することによりBOD値を求めることができる。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら、上述の微生物センサーに全く問題がないわけではなかつた。すなわち、第1図に示された様な構造では樹脂充てん部から電極への液の移動はその大部分が拡散によるものであり、樹脂充てん部内での液の移動速度は非常に小さく、電極が指示する溶存酸素濃度が安定するまでにかなりの時間を要するといった問題があつた。さらにまた、高濃度液を測定した場合には測定後溶存酸素濃度がベースラインまでもどらないといった問題も生じる場合があつた。

〔課題を解決するための手段〕

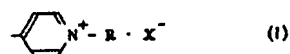
微生物センサーを用いる分析方法において、測定時間を短くする、すなわち酸素濃度等の指示を短時間でベースラインに戻すには微生物吸着担体充てん量をできるだけ小さくし、緩衝液の通液速度を大きくすることが理想的である。

しかしながら、従来一般に市販されている微生物吸着担体は微生物吸着能が低いため、上の如くすると分析が困難になるという問題があつた。

そこで、本発明者は、前記の理想的なセンサーシステムを構成すべく鋭意研究をおこなつた結果、特定のピリジニウム系高分子で被覆された水不溶性担体は微生物吸着能が高く、これを用いれば微生物吸着担体充てん量を小

さくし、通液速度を大きくしても十分微生物センサーとして利用し得ることを見出し本発明を完成した。

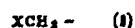
すなわち、本発明は微生物を吸着させるための一般式(1)



(式中、Rはベンジル基、フェネチル基、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル基又はペンタフルオロフェニルノチル基を、Xはハロゲン原子を示す)で表わされるピリジニウム基を分子中に含む高分子で表面を覆われた水不溶性担体を充填した容器と、これら微生物の作用により生成あるいは消費される物質を定量する電気化学デバイスを、それぞれ分離して設置したこと

と略称する)は、すべてが置換ピリジニウムポリマーで構成されたものでも、また、他の水不溶性高分子成形物の表面にのみ置換ピリジニウムポリマーを担持させ、表面を覆ったものであつても良い。

前者は公知の方法、例えばビニルピリジンとジビニル化合物、および場合によつてはそれらの共重合可能なその他のビニルモノマーと重合したのち、ピリジン環のN原子をアルキル化剤で4級化することにより得られる。また、後者は予め調製された高分子担体表面に上記ポリマーをコートすることによつて得られるが、例えば一般式(1)



(式中、Xは塩素、臭素又はヨウ素を示す)

を特徴とする微生物センサーを提供するものである。

本発明において用いる式(1)のピリジニウム基を分子中に含む高分子(以下「置換ピリジニウムポリマー」という)としては、ベンジル基、フェネチル基、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル基又はペンタフルオロフェニルノチル基から選択される基をN上の置換基として有するビニルピリジニウムハライドとジビニル化合物、および場合によつてはそれらと共重合可能なその他のビニルモノマーとをビニル重合した形のピリジニウム基を有する水不溶性高分子が挙げられる。

この置換ピリジニウムポリマーで表面を覆われた水不溶性担体(以下、「微生物吸着剤」

と表わされるハロノチル基を有する水不溶性高分子成形物に、ビニルピリジンの単独重合体あるいはビニルピリジンと共重合可能な単量体との共重合体から選択される水可溶性ビニルピリジン系重合体をハロノチル基によるピリジン環部分の四級化反応を利用して担持させた後、ビニルピリジン系重合体の未反応ピリジン部分をアルキル化剤で四級化することによつて水不溶性高分子成形物の表面にビニルピリジニウム系重合体を担持させることにより有利に調製することができる。

また、微生物吸着剤の形状は、球状、不定形塊状、繊維状あるいはフィルム状でもよく特に限定されないが、粒径 $0.1 \sim 5 \text{ mm}$ の球状のものが好ましく使用できる。

次に本発明の微生物センサーについて、その一実施例を示す第2図を用い、電極として酸素電極を使用するBOD測定を例にとり説明する。

第2図中、6は樹脂充てん容器であり、微生物吸着剤16がその中に充てんされている。7は電極であり、その測定結果は記録計12に記録される。この微生物センサーを用いて測定試料13のBOD値を測定するには、次の如くすれば良い。すなわち、まず、微生物懸濁液14が微生物吸着剤を充てんした樹脂充てん容器6を循環する様に切り換えバルブ10、11を操作し、ポンプ8を用いて微生物懸濁液を送液し、微生物吸着剤16に微生物を吸着固定化させる。BODセンサーとして

また、樹脂充てん容器6、フローセル8、測定試料13、緩衝液15は恒置槽内に設置し、測定試料13および緩衝液へはエアレーションしておくことが好ましい。

次に、切り換えバルブ11を切り換え測定試料を一定量通液し貯存酸素濃度の減少量や減少速度を測定し、あらかじめ作成しておいた検量線によりBOD値を求める。

1回の測定に要する時間は、吸着させる微生物の種類や微生物の吸着量、あるいは微生物吸着剤充てん量や通液速度等の操作条件によるが、例えば活性汚泥処理槽中の微生物を吸着させ、樹脂充てん容器として2.5mlの容器を用いた場合、操作条件として、測定試料抽入量0.5ml、通液速度5ml/minにおいて

用いる場合、通液する微生物懸濁液は、好気性微生物を含むものであればよく、活性汚泥処理槽内の懸濁液、あるいは河川水等でもよい。微生物吸着操作としては、上記の様に微生物懸濁液を樹脂を充てんした容器内に通液する方法でもよいが、微生物懸濁液内に微生物吸着剤を添加し、所定時間振とう、あるいは攪拌して吸着させた後とり出し樹脂充てん容器に充てんしてもよい。

次に切り換えバルブ10、11を操作し、緩衝液を通液する。樹脂充てん容器6を通過してくる液の貯存酸素濃度が安定し、一定のベースラインが得られるまで通液する。また、微生物に悪影響を与えない場合は緩衝液の代りにイオン交換水を使用してもよい。

3〜10分で1回の測定を行うことができる。また、BOD値500以上の高濃度試料においても10分以内でベースラインにまでもどり10分以内で測定することが可能であった。

また、第6図に示す微生物センサーは、本発明の他の一実施例であり、これによれば測定試料を一定量注入し、測定をおこなうことができる。すなわち、まず、測定試料をポンプ22によつて試料ループ17に一定量充てんする。この時緩衝液は通液されておりベースラインが得られる。次に切り換えバルブ18〜21を操作し、測定試料を緩衝液で増し出し樹脂充てん容器6に注入し、貯存酸素濃度の変化を測定するものである。

本発明の方法を用いれば、BODだけでなく

微生物吸着剤に吸着させる微生物の種類や、これらの微生物による反応によつて消費される物質あるいは生成される物質を定量する適当な電気化学デバイスを組み合わせることにより種々の微生物センサーを容易に製作することが可能である。

例えば、シユードモナス フルオレッセンズ (*Pseudomonas fluorescens*) の様にグルコースを選択的に酸化する微生物を吸着固定化し酸素電極と組み合わせればグルコースセンサーとして使用することができる。また、アンモニア性窒素を酸化して硝酸性窒素に変換するニトロソモナス (*Nitrosomonas*) やニトロバクター (*Nitrobacter*) 等の硝化菌を吸着固定化し酸素電極と組み合わせればアンモ

ニアセンサーとして、あるいはグルタミン酸脱炭酸酵素活性を有する大腸菌と炭酸ガス電極とを組み合わせることによつてアミノ酸センサーとしても使用できる。これらは本発明の微生物センサーとしての一例でありこの他にも目的に合った種々の微生物センサーを製作することができる。

(発明の効果)

叙上の本発明の特徴の1つは、微生物を吸着固定化させた微生物吸着剤を充てんした容器と電気化学デバイスを分離した形で配してこれらを配管で接続しポンプ等により充てん容器内に強制的に液を通液するシステムであるので、迅速かつ再現性よく目的物質の濃度を計測できることである。もう1つの特徴は

微生物を分子識別素子として用いるための微生物固定化担体として、微生物を強力にしかも多量に吸着するという特徴を有する微生物吸着剤を使用するため、煩雑な微生物固定化処理を行うことなく、目的に合った微生物と、適当な電気化学デバイスとを選択使用することができ、容易に種々の微生物センサーとして用いることができることである。

したがつて、本発明の微生物センサーによれば、水中のBODのほか、種々の物質、例えば糖類、アルコール類、有機酸類等を迅速かつ容易に測定することが可能となる。

(実施例)

次に実施例及び参考合成例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実

施例に何ら制約されるものではない。

実施例1

第2図に示したシステムを用い、BODセンサーを製作した。電極としては酸素電極を用いた。容積25mlの樹脂充てん容器内に、平均粒径0.3mmの参考合成例8で得たビーズ状の架橋ポリ-(1-ベンジル-4-ビニルピリジニウム)ブロミドを充てんし、まず切り換えバルブ10、11を微生物懸濁液14が、14→11→9→6→10→14のラインで循環する様に操作する。そして、微生物懸濁液をポンプ8を使つて25ml/minの流量で50分通液し微生物を吸着固定化させる。本実施例では、微生物懸濁液として活性汚泥処理槽内の懸濁液を用いた。

次に緩衝液15が樹脂充填容器8を流れて測定用フローセル8へ流れる様に切り換えバルブを操作し酸素濃度が安定し一定のベースラインが得られるまで緩衝液を通液する。

BODが既知の試料溶液を調製し、まずBOD値と溶存酸素濃度減少量の関係を示す検量線を作成する。操作方法としては、まず緩衝液を2.5 ml/minで通液しておく。そして、バルブ11を切り換えて0.2 mlだけ測定試料を通液し、もう一度バルブ11を切り換えて緩衝液を通液する。本実施例では、測定用フローセル8、樹脂充填容器8、測定試料13、緩衝液15はすべて20℃に保持した。

第3図にBOD値が120、240、500 ppmの試料を測定した時の通液時間と溶存酸素濃度変化の関係を示した。

表1

試料番号	本発明の微生物センサー (ppm)	JIS法(ppm)
1	371	360
2	182	180
3	147	150
4	72	75
5	548	500
6	187	195
7	97	87
8	86	80

この結果から明らかなように、本発明のBODセンサーによる測定値とJIS法により測定した値はよく一致している。JIS法によるBODの測定は、5日間という長い時間を必要とし、測定操作も煩雑であり熟練も必要とされるが、本発明の方法を用いることにより、

酸素濃度変化の関係を示した。いずれの場合も10分以内で溶存酸素濃度がベースラインにもどり次の測定を行うことが可能な状態になることがわかる。また、第4図は、第3図における溶存酸素濃度減少量(ΔDO)の逆数と、試料のBOD値の逆数の関係を示すもので、良好な直線関係が得られていることがわかる。すなわち、目的とする試料を通液し、その時の溶存酸素濃度減少量を計測することによりあらかじめ作成しておいた検量線よりBOD値を求めることができる。

表1は数種類の試料の本実施例で用いたBODセンサーによるBOD値と、JISK0102に規定されるBOD測定法で測定したBOD値とを示したものである。

BODを迅速にかつ容易にしかも精度よく測定することができる。

実施例2

実施例1と同様の方法で溶存酸素濃度変化を測定し、BOD値と溶存酸素濃度初期減少速度の関係について整理した。通液速度は4 ml/min、測定試料抽入量は1 mlとした。この結果を第5図に示す。この結果から明らかな様に、BOD値の逆数と溶存酸素濃度初期減少速度の間にも良好な直線関係が得られ、溶存酸素濃度初期減少速度からもBOD値を求めることができることがわかる。

実施例3

サンプルを一定量注入する方法として、第6図に示した様なシステムを用いた。本シス

テムでは測定試料を試料ループ17に一定量充てんした後、切り換えバルブ18〜21を操作して測定試料を緩衝液で増し出し試料を注入する。実施例1と同様の方法で微生物を吸着させた後、容量0.2 mlの試料ループを取り付けて、緩衝液の流量2.5 ml/minの条件でBOD値と AD_0 の関係をみた。この結果を第7図に示すが、これから明らかなように、 $1/BOD$ と $1/AD_0$ の間には良好な直線関係が得られた。

実施例4

第2図に示したシステムを用い、グルコースセンサーを製作した。操作方法は実施例1と同様であるが、微生物吸着剤にシュードモナス フルオレッセンスを吸着固定化したも

のを用いた。第8図はグルコース濃度の逆数と溶存酸素濃度減少量(AD_0)の逆数の関係を示すが、これから明らかなように良好な直線関係が得られ、本発明の微生物センサーはグルコースセンサーとして使用できることがわかる。

表2は、実際のグルコース濃度と本グルコースセンサーでの測定値を比較したものであるが、これらは非常によく一致した。

表2

本発明の微生物センサー (ppm)	実際のグルコース濃度 (ppm)
500	500
1002	1000
2008	2000
4995	5000
9967	10000
20082	20000

実施例5

微生物反応をおこなう前の試料の溶存酸素濃度を基準としてBOD測定をおこなうため、第8図に示す微生物センサーを作成した。この微生物センサーの操作方法としては、まずポンプ9を使つて実施例1と同様に微生物吸着操作を行い、微生物吸着剤への吸着固定化を行う。以下、次の順に従つて操作する。また各液の通液速度は5 ml/minとした。

操作① 切り換えバルブ11、24、25を操作して13→23→25→8→ドレンと18→11→8→6→24→ドレンの2系列のラインを作り、ポンプ23、9によりそれぞれ測定試料と緩衝液を供給する。この時の溶存酸素濃

度は測定試料の溶存酸素濃度(DO_1)である。

操作② ポンプ23を停止し、同時に切り換えバルブを操作して15→11→8→6→24→25→8→ドレンのラインを作り、緩衝液を過剰し、緩衝液の溶存酸素濃度(DO_0)を測定する。

操作③ 切り換えバルブを操作し18→11→8→6→24→25→8→ドレンのラインを作り、測定試料を1 ml通液した後、操作②の状態にもどし、この時の最低溶存酸素濃度(DO_2)を測定する。

以上の操作をくり返し、各試料の測定を行い、測定試料の溶存酸素濃度を基準とした溶

存酸素減少量($DO_1 - DO_2$)とBOD値の関係をみた。この結果を第10図に示す。第10図は $1/(DO_1 - DO_2)$ と $1/BOD$ の関係を示すものであるが、良好な直線関係が得られていることがわかる。

実施例8

樹脂充てん容器内に参考合成例7で得た平均粒径0.3mmのビーズ状の架橋ポリ-(1-フエチル-4-ビニルピリジニウム)ブロミドを充てんし、実施例1と同じ条件でBOD値と ADO の関係をみた。第11図に示す様に $1/BOD$ と $1/ADO$ の間には良好な直線関係が得られ、未知試料の ADO を測定することによりBOD値を求めることができる。

実施例7

られ、未知試料の ADO を測定することによりBOD値を求めることができる。

実施例9

樹脂充てん容器内に平均粒径0.3mmのビーズ状の架橋ポリ-(1-オクテチル-4-ビニルピリジニウム)ブロミドを充てんし、実施例1と同じ条件でBOD値と ADO の関係をみた。第14図に示す様に $1/BOD$ と $1/ADO$ の間には良好な直線関係が得られ、未知試料の ADO を測定することによりBOD値を求めることができる。

実施例10

樹脂充てん容器内に平均粒径0.3mmのビーズ状の架橋ポリ-(1-ベンジル-4-ビニルピリジニウム)クロリドを充てんし、実

施例1と同じ条件でBOD値と ADO の関係をみた。第12図に示す様に $1/BOD$ と $1/ADO$ の間には良好な直線関係が得られ、未知試料の ADO を測定することによりBOD値を求めることができる。

実施例8

樹脂充てん容器内に参考合成例4で得た平均粒径0.3mmのビーズ状の架橋ポリ-(1-エチル-4-ビニルピリジニウム)ブロミドを充てんし実施例1と同じ条件でBOD値と ADO の関係をみた。第13図に示す様に $1/BOD$ と $1/ADO$ の間には良好な直線関係が得

られ、未知試料の ADO を測定することによりBOD値を求めることができる。

実施例11

樹脂充てん容器内に平均粒径0.3mmのビーズ状の架橋ポリ-(1-ペンタフルオロフェニル)ブロミドを充てんし、実施例1と同じ条件でBOD値と ADO の関係をみた。第16図に示す様に $1/BOD$ と $1/ADO$ の間には良好な直線関係が得られ、未知試料の ADO を測定することによりBOD値を求めることができる。

実施例12

樹脂充てん容器内に、参考合成例10に示すように架橋クロルメチルステレン/ステレン共重合体ポリマービーズにポリ-(4-ビニルピリジン)を担持させた後、臭化ベンジルで四級化した平均粒径0.3mmのポリ-(1-ベンジル-4-ビニルピリジニウム)ブロミド担持ポリマービーズを充てんし、実施例1と同じ条件でBOD値と Δ DOの関係をみた。第17図に示す様に1/BODと1/ Δ DOの間には良好な直線関係が得られ、未知試料の Δ DOを測定することによりBOD値を求めることができる。

参考合成例1

架橋ポリ-(1-メチル-4-ビニルピリジニウム)クロリドの合成：

状粒子を得た。収量10.5g、共重合体の平均乾燥時粒径200 μ m、塩素含有率11%。

- (ii) 上記(i)で合成した共重合体粒子21gを加圧/減圧下加熱可能な容器中、2気圧の塩化メチルガス雰囲気下50℃にて3時間加熱した。次いで塩化メチルガスを排気し、真空中常温で乾燥することによつてピリジン基をN-メチルピリジニウム基(対イオン：塩化物イオン)にかえた架橋ポリ-(1-メチル-4-ビニルピリジニウム)クロリド粒子2.5gを得た。塩素含有率18%。

参考合成例2

架橋ポリ-(1-エチル-4-ビニルピリジニウム)クロリドの合成：

参考合成例1(ii)で合成した共重合体粒子21

- (i) 攪拌装置、コンデンサー、温度計、窒素導入管を備えた1Lセパラブルフラスコに水500gをいれ炭酸カルシウム粉末10gを加えて150rpmの速度で攪拌し、均一に分散させた。この状態でさらに4-ビニルピリジン10.5g、ジビニルベンゼン13g、アソイソブチロニトリル1gおよびイソアミルアルコール100gからなる溶液を加えたのち150rpmの速度で攪拌をつづけながら80℃にて3時間加熱した。得られたポリマー粒子を分別し、1%酢酸ですすいで炭酸カルシウムを溶解除去したのち、水洗と1%重ソウ洗淨を繰返し、最後にエタノール洗淨そして真空中乾燥することによつて、4-ビニルピリジン/ジビニルベンゼン共重合体の球

形を合成例1(ii)と同様な条件下塩化メチルガスの代わりに塩化エチルガスを反応させ、ピリジン基をN-エチルピリジニウム基(対イオン：塩化物イオン)にかえた架橋ポリ-(1-エチル-4-ビニルピリジニウム)クロリド粒子2.7gを得た。塩素含有率18%。

参考合成例3

架橋ポリ-(1-メチル-4-ビニルピリジニウム)ブロミドの合成：

参考合成例1(i)で合成した共重合体粒子21gを合成例1(ii)と同様な条件下塩化メチルガスの代わりに臭化メチルガスを反応させ、ピリジン基をN-メチルピリジニウム基(対イオン：臭化物イオン)にかえた架橋ポリ-(1-メチル-4-ビニルピリジニウム)ブ

ロミド粒子31gを得た。臭素含有率33%。

参考合成例4

架橋ポリ-(1-エチル-4-ビニルピリジニウム)プロミドの合成：

参考合成例1(ii)で合成した共重合体粒子21gを合成例1(ii)と同様な条件下塩化メチルガスの代わりに臭化エチルガスを反応させ、ピリジン基をN-エチルピリジニウム基(対イオン：臭化物イオン)にかえた架橋ポリ-(1-エチル-4-ビニルピリジニウム)プロミド粒子33gを得た。臭素含有率31%。

参考合成例5

架橋ポリ-(1-エチル-4-ビニルピリジニウム)プロミドの合成：

参考合成例1(ii)で合成した共重合体粒子10

リジン基をN-ベンジルピリジニウム基(対イオン：臭化物イオン)にかえた架橋ポリ-(1-ベンジル-4-ビニルピリジニウム)プロミド粒子20gを得た。臭素含有率25%。

参考合成例7

架橋ポリ-(1-フェネチル-4-ビニルピリジニウム)プロミドの合成：

- (i) 攪拌装置、コンデンサー、温度計、窒素導入管を備えた1Lセパラブルフラスコに水500gをいれ、炭酸カルシウム粉末10gを加えて150rpmの速度で攪拌し、均一に分散させた。この状態で更に4-ビニルピリジン105g、スチレン10g、ジビニルベンゼン18g、アゾイソプロチロニトリル1g、

gをメタノール100g中に分散させ、これに臭化エチル33gを常温常圧で加えたのち、常圧下50℃で5時間反応させた。ポリマービーズを浮別、単離し、アセトン洗浄そして真空下乾燥することにより、ピリジン基をN-エチルピリジニウム基(対イオン：臭化物イオン)にかえた架橋ポリ-(1-エチル-4-ビニルピリジニウム)プロミド粒子15gを得た。臭素含有率30%。

参考合成例8

架橋ポリ-(1-ベンジル-4-ビニルピリジニウム)プロミドの合成：

合成例1(ii)で合成した共重合体粒子10gを参考合成例5と同様な条件下臭化エチルの代わりに臭化ベンジル51gを反応させ、ピ

ロキシイソアミルアルコール100gからなる溶液を加えた後、150rpmの速度で攪拌を続けながら80℃で5時間加熱した。得られたポリマービーズを浮別し、1%酢酸ですすいで炭酸カルシウムを溶解除去したのち、水洗と1%重曹洗浄を繰返し、最後にエタノール洗浄、次いで真空乾燥を行うことによつて4-ビニルピリジン/スチレン/ジビニルベンゼン共重合体の球状粒子を得た。収量110g、共重合体粒子の平均乾燥粒径200 μ m、窒素含有率10%、この共重合体粒子をビニルピリジンポリマー(ii)とする。

- (ii) 次に上述のビニルピリジンポリマー(ii)21gをメタノール100gに懸濁させ、これに臭化フェネチル120gを加え、60℃で5

時間加熱した。ポリマービーズをろ別により単離したのち、エタノール洗浄、次いで真空乾燥することにより、ポリジン基をN-フェネチルポリジニウム基(対イオン:臭化物イオン)に代えた表題ポリマー粒子を得た。収量40g、臭素含有率23%。

参考合成例8

架橋ポリ-(1-フェネチル-4-ビニルポリジニウム)ブロミドの合成:

- (i) 参考合成例7(i)において、ステレンを0gとする以外は同じ条件で4-ビニルポリジン/ジビニルベンゼン共重合体の球状粒子を合成した。収量106g、共重合体粒子の平均乾燥粒径200 μ m、臭素含有率11%。この共重合体粒子をビニルポリジンポリマー(2)とす

臭素含有率24%。

参考合成例10

ポリ-(1-ベンジル-4-ビニルポリジニウム)ブロミド担持ポリマービーズの合成:

- (i) 攪拌装置、コンデンサー、温度計及び塩素導入管を備えた1Lセパラブルフラスコにp-クロルノチルスチレン20g、ステレン70g、ジビニルベンゼン10gおよび過酸化ラクロイル1gよりなる溶液と、水380gおよびポリビニルアルコール23g(ゴセノールGH-17、日本合成化学工業製)よりなる溶液とを加えた。次いで200rpmの速度で攪拌しながら、80℃で8時間加熱した。得られたポリマービーズをろ別した後、水洗、アセトン洗浄、次いで真空乾燥を行な

る。

- (ii) 次に参考合成例7(ii)と同様な条件にてビニルポリジンポリマー(2)21gのポリジン基をN-フェネチルポリジニウム(対イオン:臭化物イオン)にかえ、表題ポリマーを得た。収量38g、臭素含有率26%。

参考合成例9

架橋ポリ-(1-ベンジル-4-ビニルポリジニウム)ブロミドの合成:

- 参考合成例8(i)で調製したビニルポリジンポリマー(2)21gに合成例7(ii)と同様な条件で、臭化フェネチルの代わりに臭化ベンジルを反応させ、ポリジン基をN-ベンジルポリジニウム基(対イオン:臭化物イオン)にかえた表題ポリマー粒子を得た。収量38g、

うことによつて架橋クロルノチルスチレン/ステレン共重合体ポリマービーズを得た(ハロアルキルポリマー(1))。収量85g、ポリマービーズの平均粒径300 μ m、塩素含有率46%。

- (ii) 上記(i)で得たハロアルキル化ポリマー10gをポリ(4-ビニルポリジン)(数平均分子量50000)10gとメチルアルコール100gとからなる溶液に懸濁させ、還流下5時間加熱を続けた。反応混合物をろ別し、得られたポリマービーズをメタノールを溶剤としたソックスレー抽出を行なうことにより洗浄した。洗浄後のポリマービーズを真空乾燥することによりポリビニルポリジン担持ポリマービーズを得た。収量88g、臭素含有

率12%。次いで得られたポリビニルピリジン担持ポリマービーズ80gを臭化ベンジル80gとメチルアルコール50gとからなる溶液に懸濁させ、還流下5時間加熱を続けた。反応混合物を戸別し、得られたポリマービーズをアセトン洗浄した後、真空乾燥することによりポリ(N-ベンジルビニルピリジニウム)ブロミド担持ポリマービーズを得た。収量225g、臭素イオン含有率63%、これよりハロアルキル化ポリマー1g当り、290gのポリ(N-ベンジルビニルピリジニウム)ブロミドが担持されたポリマービーズが得られたことがわかる。

参考合成例11

参考合成例10(i)において、ポリ(4-ビ

リマービーズが得られたことがわかる。

参考合成例12

参考合成例10(ii)において、ポリ(4-ビニルピリジン)(数平均分子量50000)の代わりにポリ(4-ビニルピリジン)(数平均分子量200000)を使用して同様の操作を行つた。塩素含有率0.80%のポリマービーズが得られた。得られたポリマービーズ80gを臭化フエネチル100gとメチルアルコール50gとからなる溶液に懸濁させて、還流下5時間加熱を続けた。反応混合物を戸別し、得られたポリマービーズをアセトン洗浄した後、真空乾燥することにより、ポリ(N-フエネチルビニルピリジニウム)ブロミド担持ポリマービーズを得た。収量27

ニルピリジン)(数平均分子量50000)の代わりにポリ(4-ビニルピリジン)(数平均分子量10000)を使用して同様の操作を行つた。塩素含有率0.40%のポリマービーズが得られた。得られたポリマービーズ80gを臭化エチル80gとメチルアルコール50gとからなる溶液に懸濁させて、還流下、5時間加熱を続けた。反応混合物を戸別し、得られたポリマービーズをアセトン洗浄した後、真空乾燥することによりポリ(N-エチルビニルピリジニウム)ブロミド担持ポリマービーズを得た。収量22g。臭素イオン含有率22%。これよりハロアルキルポリマー(ii)1g当り、82gのポリ(N-エチルビニルピリジニウム)ブロミドを担持したポ

リマービーズが得られたことがわかる。臭素イオン含有率41%。これよりハロアルキルポリマー(ii)1g当り177gのポリ(N-フエネチルビニルピリジニウム)ブロミドを担持したポリマービーズが得られたことがわかる。

参考合成例13

ポリ-(N-ベンジルビニルピリジニウム)クロリド担持ポリマービーズの合成:

- (i) 参考合成例10(i)と同様にしてメタクリル酸ジメチルアミノエチル20g、ステレン70g、ジビニルベンゼン10gおよびアジビスイソブチロニトリル1gよりなる溶液と、水380gおよびポリビニルアルコール23g(ゴーセノールGH-17)よりなる溶液とを混合、攪拌し、65℃で8時間加熱した。

得られたポリマービーズを合成例1と同様の後処理を行なった後単離した。収量80g、ポリマービーズの平均粒径300 μ m、窒素含有率1.6%。

次に上述のポリマービーズ50gをイソプロピルアルコール200g中に懸濁させ、その中に1,3-ジプロモプロパン30gを加え、80℃で8時間加熱した。反応混合物よりポリマービーズを分別した後、アセトン洗浄、次いで真空乾燥することにより3-ブロモプロピル-ジメチルアンモニウムを有するポリマービーズを得た(ハロアルキル化ポリマー(2))。収量51g、臭素イオン含有率5.2%、共有結合性臭素含有率5.2%。

(ii) 上記(i)で得たハロアルキル化ポリマー(2)

クロリドを担持したポリマービーズが得られたことがわかる。

参考合成例14

ポリ-(N-デシルビニルピリジニウム)

ブロミド担持ポリマーの合成:

(i) ポリビニルアルコール繊維50gを200g/Lの硫酸ナトリウム、200g/Lの硫酸、40g/Lのクロルアセトアルデヒドの混合溶液200g中に加え、50℃で30分加熱した。反応後、繊維を取り出し、水洗、真空乾燥することによりクロルアセトアルデヒドでアセタール化された繊維を得た(ハロアルキル化ポリマー(3))。収量53g、塩素含有率5.0%。

(ii) 上記(i)で得たハロアルキル化ポリマー(3)

10gを使用し、参考合成例10(ii)と同様の操作を行ないポリビニルピリジン担持ポリマービーズを得た。収量25g、窒素含有率1.8%。

次いで、得られたポリビニルピリジン担持ポリマービーズ20gを塩化ベンジル20gとメチルアルコール50gとからなる溶液に懸濁させ、還流下5時間加熱を続けた。反応混合物を分別し、得られたポリマービーズをアセトン洗浄した後、真空乾燥することによりポリ(N-ベンジルビニルピリジニウム)クロリド担持ポリマービーズを得た。収量23g、塩素イオン含有率0.48%。これよりハロアルキル化ポリマー(2)1g当り4.1gのポリ(N-ベンジルビニルピリジニウム)

10gを使用し、参考合成例10(ii)と同様の操作を行ないポリビニルピリジン担持ポリマーを得た。収量105g、窒素含有率0.82%。

次いで得られたポリビニルピリジン担持ポリマー20gを臭化デシル20gとメチルアルコール50gとからなる溶液に懸濁させ、還流下5時間加熱を続けた。反応混合物を分別し、得られたポリマーをアセトン洗浄した後、真空乾燥することによりポリ(N-デシルビニルピリジニウム)ブロミド担持ポリマーを得た。収量25g、臭素イオン含有率5.2%。これよりハロアルキル化ポリマー(3)1g当り、1.16gのポリ(N-デシルビニルピリジニウム)ブロミドを担持したポリマ

ーが得られたことがわかる。

参考合成例 15

ポリー(N-ベンジルビニルピリジニウム)

プロミド担持布の調製:

- (i) 綿布 50 g を無水酢酸 350 g、プロモ酢酸 100 g および触媒量の酢酸ナトリウムからなる溶液中に懸濁させ、55℃で5時間加熱を続けた。反応終了後、綿布を取り出しアセトン洗浄、次いで真空乾燥することによりプロモアセチル化した綿布を得た(ハロアルキル化ポリマー(4))。収量 50.5 g、共有結合性臭素含有率 2.3%。

- (ii) 上記(i)で得たハロアルキル化ポリマー(4)(布) 30 g をポリ(4-ビニルピリジン)(数平均分子量 50,000) 10 g とメチル

アルキル化ポリマー(4) 1 g 当たり 80 等のポリ(N-ベンジルビニルピリジニウム)プロミドが担持された布が得られたことがわかる。

参考合成例 16

ポリー(N-メチルビニルピリジニウム)クロリド担持布の調製:

- (i) 参考合成例 15 (i) において調製されるポリビニルピリジン担持布 10 g と塩化メチル 50 g とをオートクレーブ中に仕込み、60℃で8時間加熱を続けた。反応後、そのまま減圧下乾燥し、ポリ(N-メチルビニルピリジニウム)クロリド担持布を得た。収量 10 g、塩素イオン含有率 0.80%。これよりハロアルキル化ポリマー(4) 1 g 当たり 50 等のポリ(N-メチルビニルピリジニウム)プロミド

アルコール 200 g とからなる溶液に加え、遊液下5時間加熱を続けた。反応混合物より布を取り出し、メタノールを溶剤としたソブスレー抽出を行なうことにより洗浄した。洗浄後の布を真空乾燥することによりポリビニルピリジン担持布を得た。収量 3.11 g、塩素含有率 0.32%。

次いで得られたポリビニルピリジン担持布 10 g を臭化ベンジル 80 g とメチルアルコールとからなる溶液に懸濁させ、遊液下5時間加熱を続けた。反応混合物より布を取り出し、アセトン洗浄した後、真空乾燥することによりポリー(N-ベンジルビニルピリジニウム)プロミド担持布を得た。収量 10 g、臭素イオン含有率 1.7%。これよりハロアル

キル化ポリマー(4) 1 g 当たり 80 等のポリ(N-ベンジルビニルピリジニウム)プロミドが担持された布が得られたことがわかる。

図面の簡単な説明

第1図は、特開昭62-238454号に開示の微生物センサーを示す図面である。

第2図は、本発明微生物センサーの一実施例を示す図面である。

第3図は、第2図に示す本発明微生物センサーにより測定した種々BOD値の試料による溶存酸素濃度の変化を示す図面である。

第4図は、本発明微生物センサーにより測定した溶存酸素濃度の逆数と、試料のBOD値の逆数の関係を示す図面である。

第5図は、本発明微生物センサーにより測定した溶存酸素濃度減少速度の逆数と、試料のBOD値の逆数の関係を示す図面である。

第6図は、本発明微生物センサーの他の一実施例を示す図面である。

第7図は、第6図に示す微生物センサーにより測定した溶存酸素濃度の逆数と、試料のBOD値の逆数の関係を示す図面である。

第8図は、本発明微生物センサーにより測定した溶存酸素濃度の逆数と、試料中のグルコース濃度の逆数の関係を示す図面である。

第9図は、本発明微生物センサーの更に別の一実施例を示す図面である。

第10図は、第9図に示す微生物センサーにより測定した微生物反応前後の溶存酸素濃度差の逆数と、試料中のBOD値の逆数の関係を示す図面である。

第11図～第17図は、種々の微生物吸着

剤を用いた場合の溶存酸素濃度逆数と、試料中のBOD値の逆数の関係を示す図面である。

以上

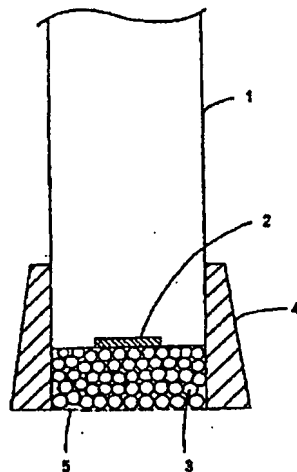
出願人 花王株式会社

代理人 弁理士 有賀三幸

弁理士 高野登志郎

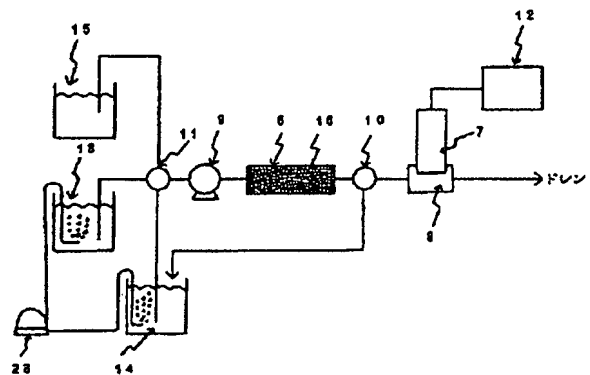
弁理士 小野信夫

第1図



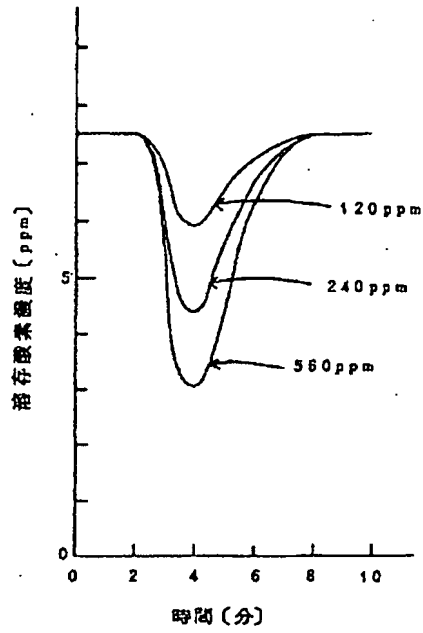
- 1: 隔膜式酸素電極
- 2: 隔膜
- 3: 水不溶性高分子化合物
- 4: ゴム栓
- 5: ナイロンネット

第2図

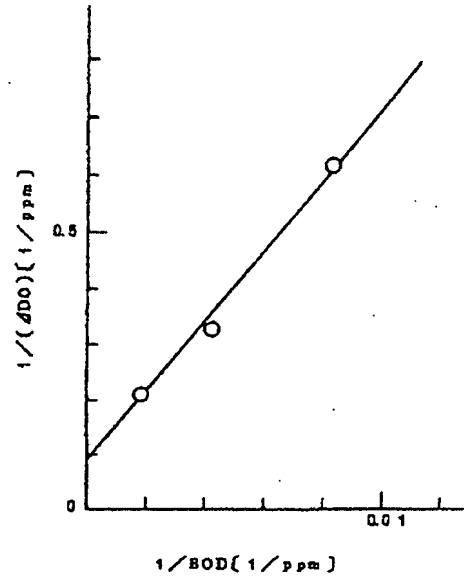


- | | |
|----------------|----------------|
| 6 菌胞充てん容器 | 13 測定試料 |
| 7 電極 | 14 微生物吸着剤 |
| 8 測定用フローセル | 15 緩衝液又はイオン交換水 |
| 9 ポンプ | 16 微生物吸着剤 |
| 10, 11 切り換えバルブ | 23 エアポンプ |
| 12 記録計 | |

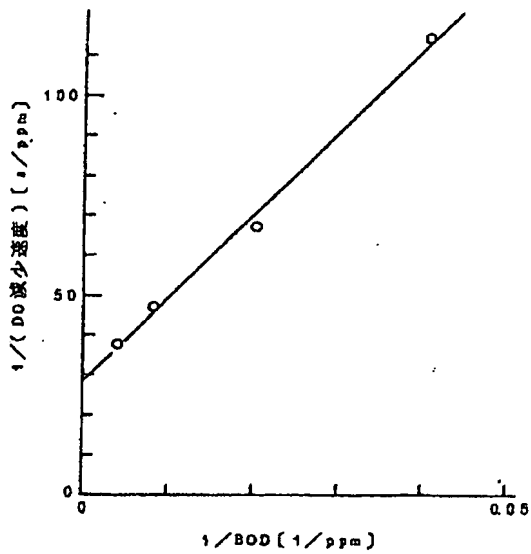
第 3 図



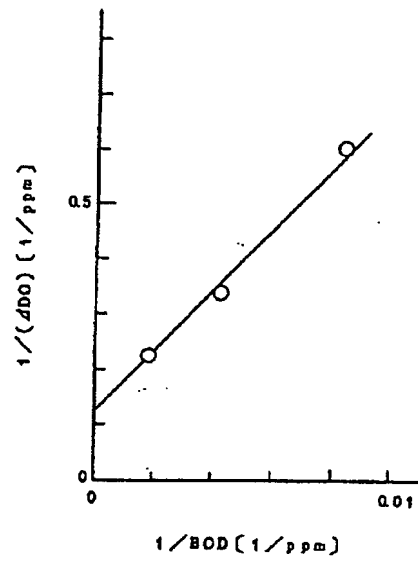
第 4 図



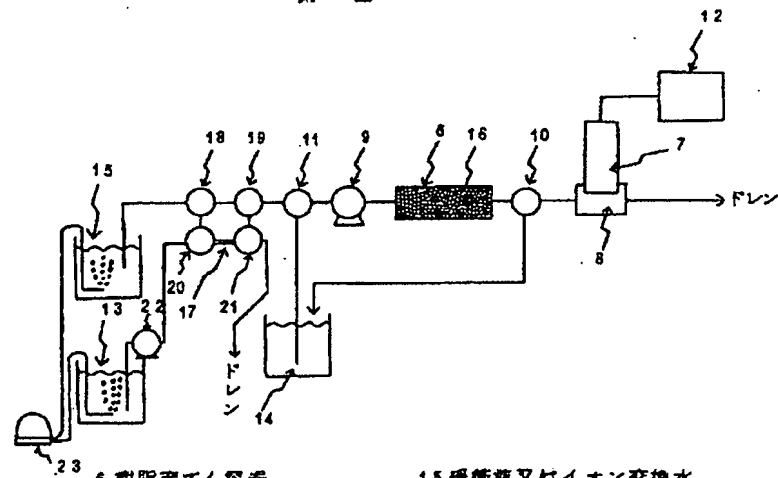
第 5 図



第 7 図



第 6 図



6 樹脂充てん容器

7 電極

8 測定用フローセル

9 ポンプ

10, 11 切り換えバルブ

12 記録計

13 測定試料

14 微生物懸濁液

15 緩衝液又はイオン交換水

16 微生物吸着剤

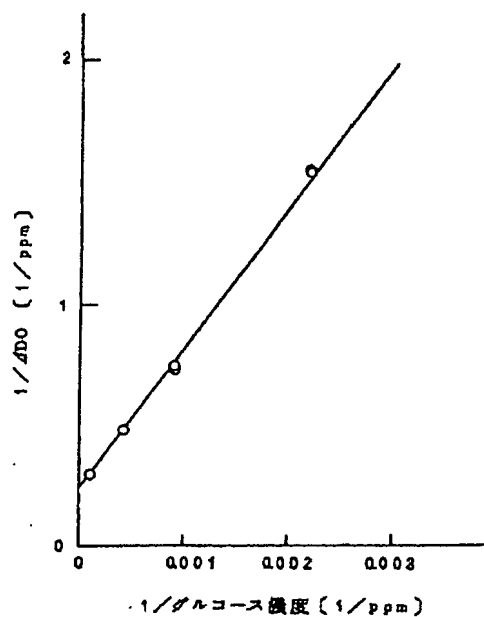
17 試料ループ

18 ~ 21 切り換えバルブ

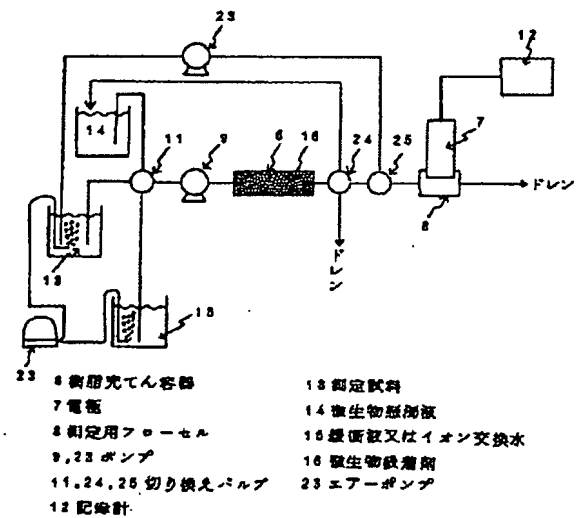
22 ポンプ

23 エアーポンプ

第 8 図



第 9 図



6 樹脂充てん容器

7 電極

8 測定用フローセル

9, 23 ポンプ

11, 24, 25 切り換えバルブ

12 記録計

13 測定試料

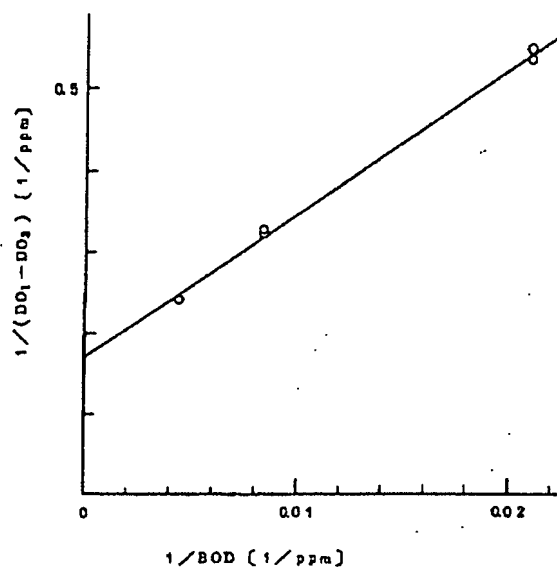
14 微生物懸濁液

15 緩衝液又はイオン交換水

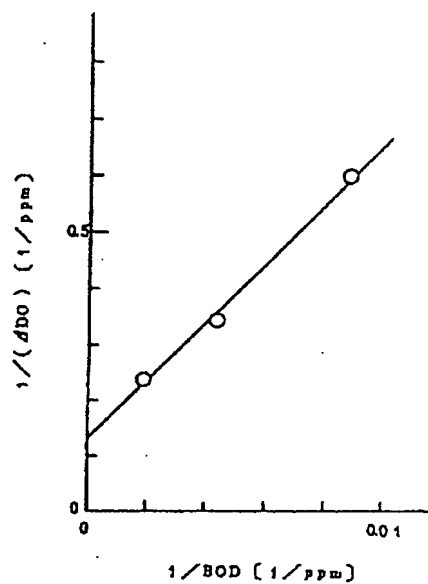
16 微生物吸着剤

23 エアーポンプ

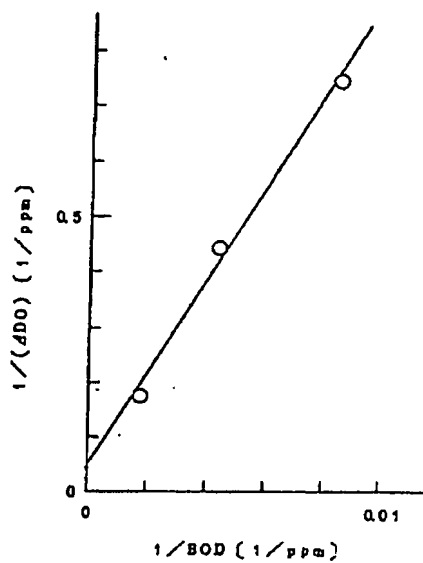
第 1 0 図



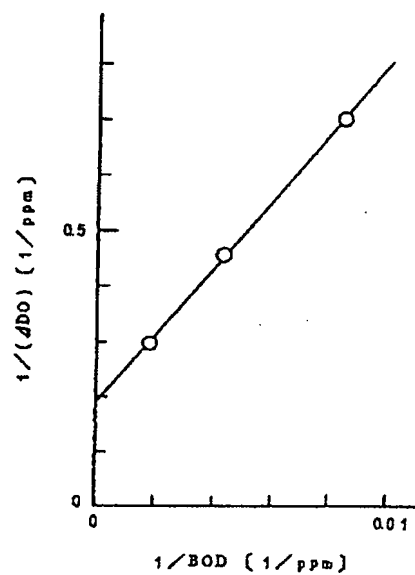
第 1 1 図



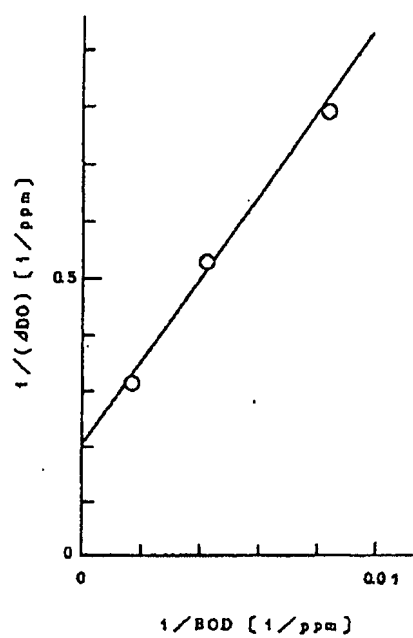
第 1 2 図



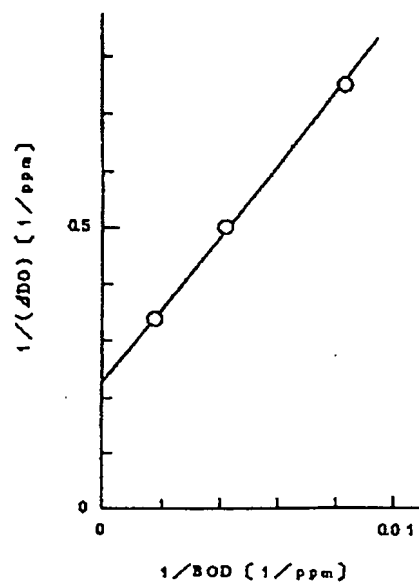
第 1 3 図



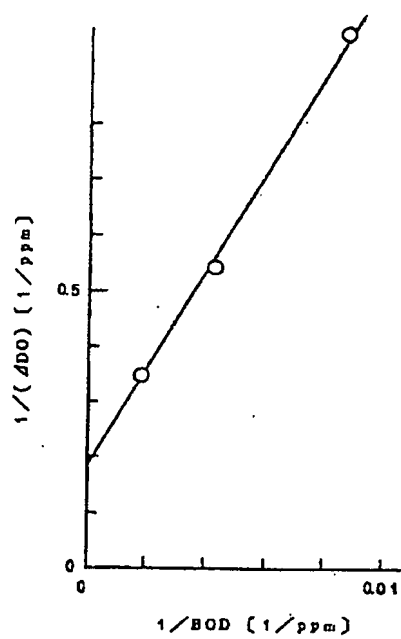
第 1 4 図



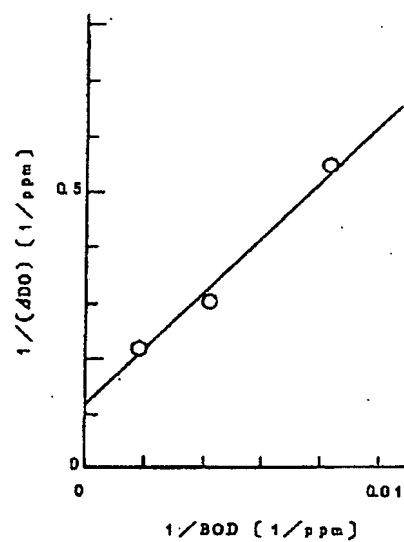
第 1 5 図



第 1 6 図



第 1 7 図



手続補正書 (自発)

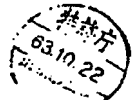
昭和63年10月21日

特許庁長官 吉田 文 毅 殿

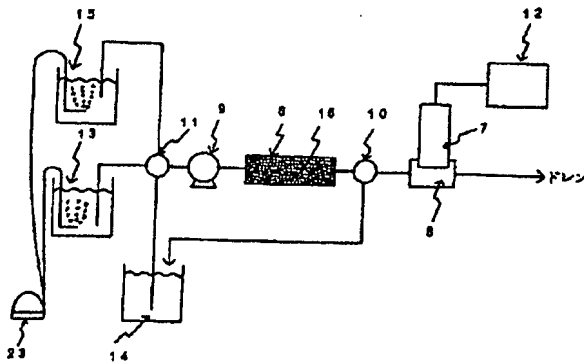
1. 事件の表示
昭和63年特許願第 238187 号
2. 発明の名称
微生物センサー
3. 補正をする者
事件との関係 出願人
名称 (091) 花王株式会社

4. 代理人
住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)
共同ビル 電話(669) 090460
氏 名 (6870) 弁理士 有 賀 三 幸
住 所 同 上
氏 名 (7756) 弁理士 高 野 登 志 雄
住 所 同 上
氏 名 (8632) 弁理士 小 野 信 夫

5. 補正命令の日付
自 発



第2図



- | | |
|----------------|----------------|
| 6 測定用容器 | 13 測定試料 |
| 7 電極 | 14 微生物感測液 |
| 8 測定用フローセル | 15 緩衝液又はイオン交換水 |
| 9 ポンプ | 16 微生物感測液 |
| 10, 11 切り換えバルブ | 20 エアープンプ |
| 12 記録計 | |

6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄および
図面

7. 補正の内容

- (1) 明細書中、第13頁第3行
「緩衝液へは」とあるを
「緩衝液15へは」と訂正する。
- (2) 第2図を別紙の如く訂正する。

手続補正書 (自発)

平成 元年 4月25日

特許庁長官 吉田 文 毅 殿

1. 事件の表示
昭和63年特許願第238187号

2. 発明の名称
微生物センサー

3. 補正をする者
事件との関係 出願人
名称 (091) 花王株式会社

4. 代理人
住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)
共同ビル 電話(669) 090460
氏 名 (6870) 弁理士 有 賀 三 幸
住 所 同 上
氏 名 (7756) 弁理士 高 野 登 志 雄

5. 補正命令の日付
自 発



6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書中、第14頁第12～13行および

第23頁第3行

「増し出し」とあるを、

「押し出し」と訂正する。